

**REMARKS**

In this Amendment, Applicant has amended Claims 19 and 25 to further specify the invention and overcome the rejections. It is respectfully submitted that no new matter has been introduced by the amended claims. All claims are now present for examination and favorable reconsideration is respectfully requested in view of the preceding amendments and the following comments.

**REJECTIONS UNDER 35 U.S.C. § 112:**

Claims 19-31 have been rejected under 35 U.S.C. § 112, second paragraph, as allegedly being indefinite for failing to particularly point out and distinctly claim the subject matter which Applicant regards as the invention. Applicant traverses the rejection.

It is respectfully submitted that in view of presently claimed invention, the rejection has been overcome. In particular, Applicant respectfully submits that "linking agent" in the field of the present invention is well understood by a person of ordinary skill in the art. A compound may be used as a linking agent, i.e. as a chemical bridge, if it has a small size molecule and retains one or more groups capable of reacting with an enzyme. Applicant preferably uses glutaraldehyde as a linking agent. It is also known that cyanuric chloride (trichlorotriazinc) and others can be used as linking agents (See attached article in Russia (English translation will be provided in a supplemental response): Immobilized Enzymes: An Introduction and Applications in Biotechnology. Michael D. TREVAN, Senior Lecture in Biotechnology, The Hatfield Polytechnic, John Wiley & Sons Chichester · New York · Brisbane · Toronto). Moreover, Claim 19 further specifies the mass % amounts of linking agent, insulin and erythrocytes. Please note that the previously presented Claim 19 uses proportion measurement. In this amendment, Applicant uses mass % measurement. Except for the different ways of measurement, there is no change in the amounts of different ingredients. In addition, Claim 25 has been

rephrased to specify that the linking agent is glutarite dialdehyde. By this amendment, all other claims also overcome this rejection due to their dependency on Claims 19 and 25. Accordingly, withdrawal of the rejection under 35 U.S.C. § 112 is respectfully requested.

REJECTIONS UNDER 35 U.S.C. § 103:

Claims 19 – 31 have been rejected under 35 U.S.C. § 103, as allegedly being obvious and unpatentable over Morenkova (Derwent abstract, ACC-NO: 1997-041104) in view of Cho et al.(US5,665,700). The Examiner points out in the office action that, given the publication of Morenkowa, the present invention only differs in the use of another amount of the linking agent, 0.05-0.15%, which reduced toxicity of the medicine. The Examiner believes that the above effect obtained is obvious to a person skilled in the art. Applicant traverses the rejection.

Although it is known that reducing the amount of a linking agent results in reduction of the medicine toxicity. It is, however, not obvious for one skilled in the art at all whether the reduction of the linking agent, in particular glutarite dialdehyde, would also result in the deterioration of the medicine quality. More specifically, it is not obvious whether an increased content of glucose in blood will occur after using the medicine with reduced linking agent comparing to using the medicine with higher level linking agent. All previous experiments attested to the contrary – it was not possible to further reduce the amount of linking agent as it would lead to a dramatic deterioration of the quality of the medicine. For example, in Morenkova, glutarite dialdehyde is not decreased below 0.15% in the final concentration. However, after Applicant carried out additional research in the present invention, Applicant unexpectedly discovered the presently claimed medicine having insulin, erythrocytes and a linking agent within the specified mass % without deterioration of its main function as an insulin-containing medicine. Therefore, it is not obvious to a person of ordinary skill in the art to discern the present invention.

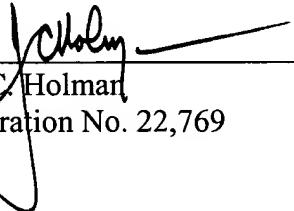
In summary, neither Morenkova nor Cho et al. have suggestion or incentive to combine these two references together to achieve the present invention. Even if combined, Morenkova and Cho et al. do not teach or suggest the present invention as in the Claims 19 – 31. Accordingly, Applicant respectfully requests that the rejection under 35 U.S.C. §103 be withdrawn.

Having overcome all outstanding grounds of rejection, the application is now in condition for allowance, and prompt action toward that end is respectfully solicited.

Respectfully submitted,

JACOBSON HOLMAN PLLC

Date: September 30, 2003  
(202) 638-6666  
400 Seventh Street, N.W.  
Washington, D.C. 20004  
JCH/jc  
Atty. Dkt. No.: P67002US0

By   
John C. Holman  
Registration No. 22,769

СЕН. 29 2003 20:05

FAX NO. : 095 7376366

FROM : INNOTECH

# Immobilized Enzymes

An Introduction and Applications  
in Biotechnology

# ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ

М. ТРИВЕН

Michael D. TREVAN  
Senior Lecturer in Biochemistry  
The Hatfield Polytechnic

вводный курс и применение  
в биотехнологии

Перевод с английского  
канд. биол. наук Е. Б. МАИЗЕЛЯ  
под редакцией  
чл.-корр. АН СССР И. В. БЕРЕЗИНЫ

Москва  
«Мир»  
1983

John Wiley & Sons  
Chichester · New York · Brisbane · Toronto

16

Глаз 1

Методы иммобилизации

шее изучение производных целлюлозы в качестве носителей для ферментов. Непрекращающаяся популярность целлюлозы обусловлена присущими ей ценным свойствами: высокой гидрофильностью, доступностью, способностью образовывать различные производные и легкостью, с которой основанные на целлюлозе полимеры можно получать либо в виде порошков, либо в виде тонких пленок. Так, Мити и Суммария опубликовали в 1961 г. методы присоединения трипсина и химотрипсина к диазотированной п-аминонбензилцеллюлозе и к гидразину. Оба эти метода используются и сейчас.

### 3. Связывающие молекулы

При использовании в качестве полимерного носителя целлюлозы более целесообразно присоединять к ней реакционноспособную группу (как в случае *п-аминонбензилцеллюлозы*), а связывать молекулы носителя и фермента с помощью какого-либо химического «мостика». Молекула, выполняющая роль мостика, должна иметь небольшие размеры, и после присоединения к целлюлозе у нее должна сохраняться еще одна группа, способная вступать в реакцию с ферментом. Этим требованиям удовлетворяет, например, хлористый иодид (трихлористый иодид), обладающий тремя реакционноспособными связями  $C - Cl$  (рис. 3). Одна из них связана очень быстро взаимодействует с целлюлозой, вторая реагирует с ферментом, а третья — с любым другим подходящим соединением. С помощью этого метода Кэй и его сотрудники [25, 27] присоединили к целлюлозе (в виде фильтровальной бумаги) галактозидазу, лактатдегидрогеназу, прурваткиназу и креатинкиназу. Особое достоинство хлористого иодида в роли связки состоит в том, что ионные свойства комплекса фермент — целлюлоза зависят от заряда связывающей молекулы. Он может быть центральным, отрицательным или положительным в зависимости от природы вещества, присоединенного по третьей связи  $C - Cl$ . Поэтому данный метод позволяет получать поликатионные фермент-целлюлозные комплексы, что очень существенно, так как при использовании

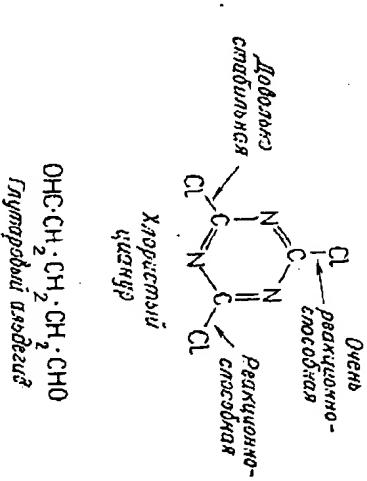


Рис. 3. Многофункциональные реагенты.

большинства других методов образуются поливинионные комплексы.

Другое соединение,вшедшее широкое применение в качестве мостика, — это глутаровый альдегид, содержащий две альдегидные группы на обоих концах цепи  $(CH_2)_5$ . Эти группы при нейтральных значениях pH реагируют со свободными аминогруппами. Таким образом, один конец молекулы глутарового альдегида может быть присоединен к носителю, а другой — к ферменту. Наиболее распространенный в настоящее время способ активации носителя связан с использованием бромистого иона ( $CNBr$ ) [5, 37]. Точный механизм взаимодействия этого соединения с целлюлозой еще предстоит выяснить, однако установлено, что при высоких значениях pH  $CNBr$ , по-видимому, легко взаимодействует с гидроксильными группами полисахаридов, а образо-

17

вавшееся производится в слабошелочном растворе реагирует затем со свободными аминогруппами фермента. Тем не менее применение этого метода вызывает некоторые затруднения, обусловленные не только необходимостью работать с бромистым цианом, но и тем, что такой способ связывания, особенно небольших молекул, не дает достаточно стабильных производных.

#### 4. Недостатки целлюлозы, ее заменители

Полисахариды не являются идеальными носителями для иммобилизации ферментов, так как они страдают двумя серьезными недостатками. Во-первых, полисахариды подвержены воздействию микробов. Ничто не вызывает такого сильного отречения, как вид колонии микробов, жадно поедающих прекрасный препарат иммобилизованного фермента, особенно если это происходит в условиях промышленного производства! Во-вторых, целлюлоза способна нестецифически сорбировать значительные количества белка. А это означает, что по окончании промышленного опыта иммобилизованный фермент необходимо тщательно отмыть буфером с высокой ионной силой. Такая процедура при ее проведении в больших масштабах не только дорогостояща, но зачастую приводит к инактивации фермента, особенно в тех случаях, когда его активная форма представляется собой димер или олигомер (см. гл. 2, разд. II, 1).

Большое число работ было посвящено поискам таких полимерных носителей, которые были бы гидрофильными, но не подвержены воздействию микробов. В 1964 г. Левин и Гольдштейн независимо друг от друга сообщили об использовании в качестве носителя для различных ферментов сополимера этилена и малеинового ангидрида. Среди других материалов успешное применение нашли стекло [47] и пайлон [22]. Более общий подход к созданию носителей разработали Иман и Дицис [21], которые в 1969 г. впервые использовали различные производные поликарбамата. В настоящее время в продаже имеется множество различных готовых к употреблению акриловых сополимеров, реакционноспособные группы которых обычно представляют собой диазопропен.

Многофункциональные реагенты можно применять не только для присоединения молекул фермента к целлюлозе или другим полимерам, но и для связывания молекул фермента друг с другом. Хотя такая матрица может поддерживать только один молекулы фермента, с экономической точки зрения обычно более целесообразно получать сополимеры фермента с инертным белком, например с альбумином, чтобы увеличить объем конечного продукта.

К наиболее широко используемым многофункциональным реагентам относится глутаровый альдегид. Альдегиды вообще и глутаровый альдегид в особенности давно применяются гистологами в качестве фиксирующих реактивов. Гелеобразующее действие альдегидов на белки было отмечено Бэйкером еще в 1910 г. По существу, это старое наблюдение не утратило своего значения и сегодня. С помощью глутарового альдегида исключительно трудно осадить из раствора белковую матрицу, в лучшем случае раствор превращается в гель. Для того чтобы получить нерастворимую матрицу, состоящую из фермента и глутарового альдегида, необходимо либо заполимеризовать глутаровый альдегид, либо осадить фермент (или адсорбировать его на поверхности какого-либо нерастворимого носителя). В результате увеличивается длина связывающей молекулы или уменьшается расстояние между молекулами фермента. Воспользовавшись таким подходом, Ричард [39], Огара [35], Иенсен [23] и Узбаб [17] сшили лоперечными мостиками и перевели в нерастворимую форму кристаллическую карбоксилатную матрицу. А, субтилизив почку, папили и трипсин соответственно.

Глутаровый альдегид можно также использовать для приготвления пленок поперечно сшитого фермента с